

# ФОРМИРОВАНИЕ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ВИРУСНЫЕ И БАКТЕРИАЛЬНЫЕ АНТИГЕНЫ ПОСЛЕ КУРСА УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ОБЛУЧЕНИЙ В СУБЭРИТЕМНЫХ ДОЗАХ

С.А. Снопов

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург

**Development of immunity against viral and bacterial antigens after repeated exposures to suberythral doses of ultraviolet light**

S.A. Snopov

Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences Saint-Petersburg, Russia

**Резюме.** Эффекты ультрафиолетового (УФ) излучения в отношении инфекционного иммунитета человека изучены недостаточно. С одной стороны, показано, что УФ-лучи солнца или искусственных источников меняют содержание цитокинов в человеческой коже, численность субпопуляций лимфоцитов в периферической крови, синтез ДНК и пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены. С другой стороны, замечены лишь единичные примеры того, что УФ-облучения (УФО) способны повлиять на течение инфекционного процесса: у человека, например, в эритемных дозах индуцировать рецидив везикулярных высыпаний, вызываемых вирусом герпеса. Изучение же УФО в субэритемных дозах, традиционно используемых в отечественной профилактической медицине, велось лишь до 1970-х гг. и в последние 30 лет практически остановилось. В нашей работе мы выясняли, меняют ли профилактические УФО, проводимые в детских коллективах, иммунный ответ детей на инфекционный конъюнктивит, на одновременное введение полиомиелитной и коревой вакцин или полиомиелитной и АДС/АДСМ-вакцин. В периферической крови оценивали количественные изменения в представителе главных типов лейкоцитов (моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, лимфоциты), основных классов лимфоцитов (Т-, В- и NK-клетки), регуляторных субпопуляций лимфоцитов ( $CD4^+$  и  $CD8^+$ ), активированных клеток ( $CD25^+$  и  $HLADR^+$ ), ДНК-синтетическую активность мононуклеаров, продукцию цитокинов (IL-1 бета и TNF-альфа, IFN-гамма и IL-10), а также коревых и дифтерийных антител. Полученные результаты указывают на то, что субэритемные УФО модулируют формирующийся инфекционный ответ, увеличивая в крови доли  $CD25^+$  и  $HLADR^+$  клеток, уровни IL-1 бета и IL-10 и активируя мононуклеары, отвечающие на PWM-митоген. Такая иммуномодуляция не приводит к ослаблению специфического антителообразования и противoinфекционной защиты в целом, о чем свидетельствуют и эпидемиологические данные.

**Ключевые слова:** УФ-облучения, иммунитет, вакцинация, лимфоциты, цитокины.

## Введение

Ультрафиолетовые облучения (УФО) кожного покрова в субэритемных дозах традиционно на-

**Abstract.** The effects of ultraviolet (UV) radiation on human infectious immunity are not well studied. On the one hand, solar and artificial UV sources have been shown to change cytokine levels in human skin, lymphocyte subpopulation counts in peripheral blood, lymphocyte DNA synthesis and proliferative response to mitogens. On the other hand, there are just only one or two observations suggesting an influence of UV radiation on human infection course. For instance, UV irradiations have been reported to induce a recurrence of orofacial vesicular lesions caused by herpes simplex virus. Moreover, there is a lack of data concerning immune effects of suberythral doses of UV in spite of a long history of using them by Russian prophylactic medicine. In this work we questioned whether such suberythral UV exposures can affect the immune responses of children to infectious conjunctivitis, to simultaneous measles and polio vaccinations and to simultaneous polio and diphtheria-tetanus vaccinations. In peripheral blood of vaccinated children we examined leukocyte counts (monocytes, neutrophils, eosinophils, lymphocytes), percentages of lymphocyte subpopulations ( $CD3^+$ ,  $CD20^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD25^+$ ,  $HLADR^+$ ), concentrations of cytokines (IL-1 beta, TNF-alpha, IFN-gamma and IL-10), DNA-synthetic activity of lymphocytes and titres of antibodies against measles and diphtheria toxin. We observed no local or systemic reactions to the vaccines in the UV-group while a moderate rise in body temperature occurred in several children from unexposed group. In the blood of children from UV-group we found increases in  $CD25^+$  and  $HLADR^+$  cell percentages, IL-1 beta and IL-10 concentrations, PWM-induced DNA synthesis in mononuclears, and no decreases in formation of antibodies against measles and diphtheria. We concluded that suberythral UV exposures of children modulated their further responses to immunisations perhaps through the activation of a T helper 2-like reactions which appear to bring no negative influence on anti-infectious defence. Vitamin D and other mediators are supposed to play a crucial role in UV-induced immunomodulation.

**Key words:** UV-exposures, immunity, vaccination, lymphocytes, cytokines.

значаются для предотвращения рахита в течение первого года жизни, для неспецифической профилактики инфекционных болезней и для укреп-

пления общего здоровья детей и взрослых, проживающих в северных широтах и испытывающих дефицит солнечного света. Рекомендации к проведению оздоровительно-профилактических УФО в детских и взрослых коллективах основаны на данных, накопленных советской медициной к 1990-м гг., о том, что такие облучения способствуют улучшению неспецифического иммунитета, снижению частоты инфекций верхних дыхательных путей и облегчению их течения, снижению частоты постинфекционных осложнений, увеличению титров специфических антител после вакцинаций и снижению частоты поствакцинальных реакций [1–5]. Курс профилактических УФО обычно начинается с  $1/8$ – $1/2$  минимальной эритемной дозы (МЭД) и состоит из 18–25 облучений, дозы которых постепенно достигают 2–4 первоначальных МЭД, но остаются субэритемными.

В зарубежных работах последних десятилетий в основном изучались иммуносупрессивные эффекты УФО. В нескольких экспериментальных моделях инфекций человека, вызываемых вирусами, бактериями, грибами, простейшими и нематодами у линий грызунов, чувствительных к воздействию УФ-излучения, показано, что оно подавляет их ответ на инфекцию, и частично установлен сложный механизм, лежащий в основе такого подавления [17, 18]. Однако оказывается, что эффекты, производимые УФ-облучениями в иммунитете таких животных, не вполне годятся для предсказаний в отношении иммунитета человека. Так, при обследовании студентов-добровольцев, получавших несколько ежедневных УФО участка кожи 1 эритемной дозой, не удалось выявить ни изменений клеточного ответа на последующую иммунизацию вакциной против гепатита В, ни выработки антител к белку этого вируса по сравнению с добровольцами, вакцинированными без предварительных облучений [21], — в отличие от мышей, у которых курс УФО в сопоставимых дозах сопровождался супрессией как клеточного, так и гуморального ответов на антигены вируса гепатита В [22]. Установлено, что у человека иммунные функции лимфоцитов, кератиноцитов и кожных макрофагов (клеток Лангерганса) гораздо менее чувствительны к УФ-излучению, чем у мышей и крыс [8]. Возможно, по этой причине обнаруживается очень мало прямых свидетельств негативного влияния УФ-излучения на инфекционный иммунитет человека. Сообщалось только, что УФО могут играть роль в обострении латентной инфекции, вызванной вирусом *Herpes simplex*, с высыпаниями в оролабиальной области и способствовать переходу папилломавирусной инфекции в плоскоклеточный рак [16]. Наличие таких данных диктует необходимость новых прямых исследований для подтверждения безопасности и целесообразности

проведения оздоровительно-профилактических УФО. Целью настоящей работы стало изучение влияния таких УФО на клеточные и гуморальные показатели иммунитета детей, иммунизируемых вакцинами против вирусных и бактериальных инфекций. Проект работы был одобрен этическим комитетом НИИ детских инфекций ФМБА России, и в ее выполнении большую помощь оказали сотрудники отдела профилактики инфекционных заболеваний.

Исследование включало две группы детей, иммунизированных в соответствии с календарем прививок: первая группа получала коревую вакцину одновременно с вакциной против полиомиелита, а вторая — вакцину против дифтерийного и столбнячного токсинов одновременно с вакциной против полиомиелита. Для оценки иммунного ответа у детей определяли в периферической крови на нескольких сроках до и после вакцинации численное представительство различных типов и популяций лейкоцитов и лимфоцитов, ДНК-синтетическую активность мононуклеарных лейкоцитов, содержание регуляторных цитокинов и титры специфических антител. Сопоставление всех показателей у детей, получавших и не получавших УФО перед вакцинацией, позволило выявить достоверные отличия в формировании их ответа на иммунизацию.

### Материалы и методы

Были обследованы 54 ребенка в возрасте 13–48 мес., проживавших в специализированном доме ребенка № 7 г. Санкт-Петербурга. В подгруппы для проведения курса УФО дети были распределены с помощью простой рандомизации. Дети этих подгрупп и дети контрольных подгрупп, не получавшие УФО, были сопоставимы по возрасту и имели одинаковые условия жизни и физического развития, питание и режим на протяжении нескольких месяцев перед исследованием. Облучения и последующая вакцинация проводились в весенний период (март — апрель). За предшествующее полугодие дети не получали УФО от искусственных источников и проводили ежедневно лишь 1–2 ч во время прогулок при естественном свете, который в зимние месяцы на широте Санкт-Петербурга содержит ничтожно малую долю УФ-лучей.

**УФ-облучения.** УФО кожного покрова детям осуществляли в соответствии с официальными руководствами для педиатров и физиотерапевтов [2, 3]. Курс УФО состоял из 17–20 ежедневных (с пропуском выходных дней) процедур, начатых за 3,5–4 нед. до намеченной вакцинации. Использовали излучатель российского производства, утвержденный Минздравом для использования в профилактической медицине и в качестве источника для загара. Излучатель содержал 6 ламп ЛЭ-15, эмиттирующих свет широкого спектра с пре-

обладанием УФ-В лучей. При каждой процедуре облучали заднюю и переднюю поверхности тела с обязательной защитой глаз ребенка специальными очками. Курс УФО начинали с 1/4 средней минимальной эритемной дозы (МЭД), установленной для 10 детей перед началом исследования. Измеренная UV-31 датчиком UVX-радиометра (Сан-Габриэл, Калифорния, США) эта начальная доза составляла 60–96 J/m<sup>2</sup> в УФ-В диапазоне. После каждых двух процедур дозу повышали на 50–100 J/m<sup>2</sup> при следующих облучениях, так что в последних процедурах курса она достигала 750 J/m<sup>2</sup>. Суммарные дозы, полученные каждым индивидуумом, составили по 6685–8700 J/m<sup>2</sup> на переднюю и заднюю поверхности тела.

*Клиническое обследование и вакцинация.* Введение вакцин проводилось через 2 дня после заключительной процедуры УФО. Дети первой группы (17 чел.) получали одновременно коревую и полиомиелитную вакцины, а дети второй группы – вакцину АДСМ (39 чел.) или АДС (5 чел.) одновременно с полиомиелитной вакциной. Все обследованные дети уже получали ранее согласно индивидуальному графику прививок от 1 до 5 введений полиомиелитной вакцины, в среднем  $3,5 \pm 1,5$  (УФ-облучавшиеся) и  $3,0 \pm 1,7$  (необлучавшиеся); достоверного различия между подгруппами по этому показателю не было (критерий Манна – Уитни). Все дети, иммунизированные вакциной АДС или АДСМ, ранее уже получали от 1 до 3 ее введений, в среднем  $2,4 \pm 0,7$  (УФ-облучавшиеся) и  $2,3 \pm 0,8$  (необлучавшиеся); достоверного различия между подгруппами не было и по этому показателю. У всех получивших коревую вакцину на момент ее введения не имелось документированной предшествующей коревой иммунизации, однако двое детей ранее уже были иммунизированы, как обнаружилось впоследствии по высоким титрам противокоревых антител в их крови сразу со дня вакцинации.

Использовали противокоревую вакцину московского предприятия по производству бактериальных препаратов, полиомиелитную вакцину производства Института полиомиелита и вирусного энцефалита им. М.П. Чумакова, вакцины АДСМ и АДС производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ.

В поствакцинальном периоде у детей отслеживали местные и системные клинические реакции на иммунизацию: покраснение кожи, симптомы интоксикации, лихорадки и воспаления верхних дыхательных путей.

Ход исследования осложнился тем, что за неделю до запланированной иммунизации у всех детей первой группы (как получавших курс УФО, так и не получавших) синхронно развились признаки острого инфекционного конъюнктивита с двусторонней гиперемией конъюнктивы, гнойным отделяемым

и умеренными назофарингеальными симптомами. Лабораторного определения точной этиологии этой инфекции не проводилось; известно, что она может вызываться несколькими микробными агентами, включая вирусы (наиболее часто – аденовирусом) и бактерии (наиболее часто – *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*). Все заболевшие дети получали местное лечение глазными каплями 20% сульфацила натрия дважды в день в течение 4–5 дней и ко дню вакцинации находились в стадии выздоровления. В день вакцинации почти все дети этой группы уже не обнаруживали симптомов конъюнктивита и после специального обследования врачом-вакцинологом были иммунизированы в соответствии с официальными директивами обеими вакцинами – коревой и полиомиелитной. Лишь двое (один ребенок из получавших УФО и один – из не получавших) еще имели локальные симптомы конъюнктивита (остаточную экссудацию) и были иммунизированы в этот день только полиомиелитной вакциной, а коревую получили 2 неделями позже; результаты их обследования мы сопоставляли наряду с остальными детьми в этих подгруппах. Изменения показателей иммунитета, имевшие место вследствие инфекции конъюнктивы у детей первой группы, мы рассмотрели отдельно.

*Исследование параметров иммунитета.* Около 1,5 мл венозной крови забирали в пробирку с гепарином (25 ед/мл). Мазки крови окрашивали гематоксилин-эозином для подсчета лейкоцитарной формулы, который проводился лаборантом, не информированным об индивидуальной принадлежности окрашенных препаратов. Мононуклеарные клетки выделяли центрифугированием в градиенте плотности, определение клеток с поверхностными рецепторами CD3, CD4, CD8, CD20, CD25, HLADR проводили иммуноцитометрическим методом с использованием моноклональных антител производства «Dako» (Дания). Долю каждой субпопуляции клеток определяли в процентах от общего числа мононуклеарных лейкоцитов. Кроме того, рассчитывали долю лимфоцитов, не принадлежащих к Т- или В-клеткам, путем вычитания суммарного процента CD3- и CD20-позитивных лимфоцитов от 100%; полученное число CD3<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> клеток использовали для оценки доли естественных киллерных (NK) лимфоцитов, поскольку во время исследования мы не располагали антителами к CD16/CD56-маркерам. Образцы плазмы центрифугированной крови были тестированы на содержание цитокинов IL-1 бета, TNF-альфа, IL-2, IL-10 и IFN-гамма с помощью наборов для иммуноферментного анализа (R&D Systems Europe, Великобритания) в соответствии с инструкциями изготовителя. В тех образцах, где уровень цитокина был ниже порога чувствительности метода, его содержание в плазме условно принимали не за 0, а

за 0,1 пг/мл, чтобы иметь возможность анализировать результаты в логарифмическом выражении.

ДНК-синтетическую активность мононуклеарных лейкоцитов оценивали *in vitro* по включению в них меченного тритием тимидина, добавлявшегося в дозе 10 мкКю/мл в среду к клеткам за 20 ч до окончания их 72-часового культивирования. Культивирование вели в лунках 96-луночного планшета, поместив 0,05 мл гепаринизированной крови в 0,2 мл среды RPMI 1640 с 2 мМ L-глутамин, 10 мМ HEPES, 100 мкг/мл гентамицина сульфата. Клетки каждого образца крови культивировали как без митогенов, так и митогенами, добавляя в среду 15 мкг/мл PHA (Sigma, США) в одной серии опытов и 5 мкг/мл PWM (Sigma, США) в другой серии. По окончании культивирования содержимое лунки переносили на стекловолоконный фильтр, промывали последовательно дистиллированной водой, 5% трихлоруксусной кислотой, 96% этанолом и измеряли радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика Beckman — Coulter (США). Уровень ДНК-синтетической активности мононуклеаров каждого образца крови устанавливали по среднему значению счета (в имп/мин) трех идентичных культур.

Определение титров противокоревых и противодифтерийных антител в плазме крови проводили стандартными методами в реакциях торможения гемагглютинации с коревым эритроцитарным антигенным диагностикумом и не прямой гемагглютинации с дифтерийным эритроцитарным антигенным диагностикумом (АО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Московская обл., Россия).

**Статистический анализ результатов.** Для оценки значимости изменений изучавшихся параметров во времени использовали тест Wilcoxon для парных переменных. Для сравнения показателей между УФ-облучавшимися и необлучавшимися индивидуумами использовали Wilcoxon/Mann-Whitney U-критерий для независимых переменных.

## Результаты и обсуждение

### 1. Инфекционный конъюнктивит

#### 1.1. Реакция периферической крови на острый инфекционный конъюнктивит

Обследование детей к исходу 1-й нед. после клинического начала конъюнктивита показало, что развитие иммунного ответа на инфекцию сопровождалось значительными отклонениями целого ряда показателей периферической крови от уровней, характерных для здоровых детей этого возраста. Так, у заболевших оказались повышенными общая доля лимфоцитов (в среднем до  $59 \pm 8\%$  от всех лейкоцитов) и относительное содержание  $CD20^+$  и  $HLADR^+$  клеток ( $46 \pm 7\%$  и  $48 \pm 9\%$  от всех мононуклеаров соответственно), а сниженными — доля нейтрофильных лейкоцитов ( $29 \pm 5\%$ ) и проценты

$CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD25^+$  клеток ( $37 \pm 5\%$ ,  $29 \pm 5\%$ ,  $18 \pm 3\%$ ,  $2 \pm 1\%$  соответственно).

Концентрации каждого из пяти определявшихся в плазме цитокинов, если судить по средним значениям для всех обследованных, не были повышены, поскольку у большинства детей оказывались ниже границ, указываемых для здоровых лиц производителем использовавшихся тест-систем. Тем не менее, у 10 из 17 детей выявлялись более высокие уровни или одного, или двух цитокинов: TNF-альфа — у 6 детей (16,0; 19,0; 19,4; 19,4; 52,9 и 62,1 пг/мл), IL-1 бета — у 3 детей (5,2; 4,1 и 6,5 пг/мл), IL-10 — у 3 детей (8,1; 37,2 и 57,8 пг/мл).

Перечисленных выше сдвигов в представительстве различных лимфоцитов в крови заболевших не обнаруживалось уже через сутки после первого тестирования, что, по всей вероятности, отражало, наряду с полным исчезновением к этому времени клинических симптомов конъюнктивита, установление иммунной системой эффективного контроля над инфекцией.

#### 1.2. Влияние УФО на развитие ответа на инфекционный конъюнктивит

Сопоставление средних нормализованных значений тестированных показателей в двух подгруппах заболевших показало, что в крови детей, получавших УФО, достоверно более высоким был процент  $CD25^+$  клеток (в среднем  $2,7 \pm 0,5\%$  против  $1,1 \pm 0,3\%$  у необлучавшихся,  $p = 0,031$ ) и не наблюдалось того увеличения содержания  $CD3^+$   $CD20^+$  клеток, которое обнаруживалось в ответе на конъюнктивит у детей, не получавших облучения ( $13,4 \pm 6,9\%$  против  $21,0 \pm 4,8\%$  соответственно,  $p = 0,018$ ).

Различий между УФ-облучавшимися и необлучавшимися детьми в уровнях определявшихся в плазме цитокинов не было выявлено. Несколько более высокое среднее значение содержания TNF-альфа у детей УФО-подгруппы не было статистически достоверным. Отличий в клинических проявлениях конъюнктивита у УФ-облучавшихся и необлучавшихся детей также не было: он начался одновременно у всех детей, его симптомы имели одинаковую выраженность и сохранялись на протяжении недели.

### 2. Введение коревой и полиомиелитной вакцин

#### 2.1. Реакция периферической крови на введение коревой и полиомиелитной вакцин

После вакцинации у всех детей первой группы средние показатели относительного содержания моноцитов, незрелых лейкоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и общего числа лимфоцитов на сроках 1, 2, 3 и 7 дней не изменялись существенно по

сравнению с таковыми, определявшимися непосредственно перед вакцинацией. Изменения наблюдались в процентном содержании CD3<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup> (~NK) клеток, а также CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, которые через 1 сут после вакцинации возвратились в пределы нормальных значений от предшествующих значительных сдвигов, связанных с инфекционным конъюнктивитом (см. раздел 1.1.). Кроме того, через 1 сут после вакцинации доля CD25<sup>+</sup> лимфоцитов увеличивалась по сравнению с предыдущим днем (в среднем с  $2,0 \pm 0,3$  до  $11,4 \pm 2,7\%$ ,  $p < 0,001$ ); после чего на 3-й и 7-е сут процент этих клеток в крови вновь стал низким (в среднем до  $1,4 \pm 0,5$  и  $1,3 \pm 0,2\%$  соответственно).

Наряду с увеличением доли CD25<sup>+</sup> лимфоцитов, на 1-е сут после вакцинации определялось повышение уровней в плазме двух цитокинов — IL-1 бета (в среднем с  $1,9 \pm 0,6$  до  $4,0 \pm 0,5$  пг/мл,  $p = 0,004$ ) и IL-10 (в среднем с  $9,2 \pm 3,8$  до  $95,6 \pm 36,9$  пг/мл,  $p = 0,016$ ). Повышенными они оставались и на 3-й, и на 7-е сут после вакцинации: IL-1 бета —  $5,1 \pm 0,7$  и  $3,5 \pm 0,7$  пг/мл и IL-10 —  $68,4 \pm 30,0$  и  $68,7 \pm 35,71$  пг/мл. Факт повышения содержания в плазме IL-1 бета и IL-10 хорошо согласуется с имеющимися представлениями о том, что энтеровирусы стимулируют продукцию обоих этих интерлейкинов, наряду с другими цитокинами, такими как TNF-альфа и IL-2. Однако мы не выявили сколько-нибудь существенных изменений уровней в плазме IL-2 и TNF-альфа, так же, как и IFN-гамма.

Титры противокоревых антител ожидаемо выросли к 1-му и 7-му мес. после иммунизации от нулевых значений до 1:20 — 1:160 у всех обследованных, кроме одного ребенка из подгруппы необлучавшихся, у которого этот титр оставался ниже 1:5.

## 2.2. Влияние УФО на иммунизацию коревой и полиомиелитной вакцинами

У вакцинированных детей, получавших УФО, достоверно выше оказывались процентное содержание моноцитов, нейтрофилов, HLADR<sup>+</sup> лимфоцитов к 1-м сут и эозинофилов — на 1–7-е сут после вакцинации, а также концентраций IL-1 бета к 1-м сут и IL-10 — к 3-м сут (рис. 1, 2, 4, 12–14); а достоверно ниже — относительное число всех лимфоцитов к 1-м сут и процент палочкоядерных лейкоцитов — к 3-м сут (рис. 3, 5).

При клиническом наблюдении у большинства детей не было выявлено местных или системных реакций, но у троих необлучавшихся детей определялось умеренное повышение температуры тела до  $38,0–38,5^\circ\text{C}$  на 8–10-е сут после вакцинации.

Несмотря на то, что у детей, получавших УФО, титры противокоревых антител через 1 и 7 мес. после вакцинации оказывались в среднем несколько более высокими, чем у необлучавшихся (рис. 15), такое отличие не стало достоверным.

## 3. Введение АДСМ/АДС и полиомиелитной вакцин

### 3.1. Реакция периферической крови на введение АДС/АДСМ и полиомиелитной вакцин

Тестирование детей 2-й группы на сроках 1, 2, 3 и 6 нед. после вакцинации не выявило существенных изменений средних значений относительного и абсолютного содержания незрелых лейкоцитов, нейтрофилов, эозинофилов и общего числа лимфоцитов по сравнению с таковыми, определявшимися непосредственно перед вакцинацией. Достоверным оказывалось лишь увеличение процента моноцитов к 3-й нед. после вакцинации, в среднем — примерно вдвое от их исходного уровня, с  $2,0 \pm 1,5\%$  до  $4,7 \pm 2,9\%$  ( $p < 0,001$ ) от абсолютного числа всех лейкоцитов, исходно составлявшего  $7,1 \pm 2,6 \cdot 10^3$  кл/мл, а к 3-й нед. —  $8,0 \pm 2,8 \cdot 10^3$  кл/мл.

Титры антител к дифтерийному токсину постепенно нарастали от исходных значений перед иммунизацией у всех обследованных и к 3 и 6 нед. определялись на уровне 1:80 — 1:5120.

### 3.2. Влияние УФО на иммунизацию АДСМ/АДС и полиомиелитной вакцинами

Отмеченное выше увеличение числа моноцитов к 3-й нед. после вакцинации у детей второй группы, получавших УФО, было более выраженным и достигало более высоких значений, чем у необлучавшихся ( $5,97 \pm 2,80\%$  против  $3,75 \pm 2,11\%$ ,  $p = 0,036$ ).

Кроме того, у детей, получивших курс УФО, в период с 1-й по 3-ю нед. после вакцинации определялся более высокий уровень включения меченого тимидина в мононуклеарные клетки крови при их культивировании *in vitro* с PWM (рис. 19), наиболее выраженным это отличие было к концу 1-й нед. —  $3920 \pm 240$  имп/мин против  $1030 \pm 130$  имп/мин у необлучавшихся,  $p = 0,0003$ . Уровни включения тимидина в клетки, не стимулированные или стимулированные фитогемагглютинином у детей, получавших и не получавших УФО, не отличались (рис. 17 и 18).

На протяжении полувека в регионах России с недостаточной инсоляцией рекомендовалось проведение профилактических УФ-облучений в детских и взрослых коллективах. Вопросу о том, могут ли такие облучения, кроме ожидаемой пользы, производить какие-либо нежелательные эффекты на здоровье, не уделялось большого внимания, пока эксперименты на нескольких животных моделях инфекций человека не показали, что УФО в дозах, существенно более высоких, чем применяемые в профилактической медицине, могут приводить к подавлению гиперчувствительности замедленного типа, увеличению у инфицированных животных количества микроорганизмов и затягиванию

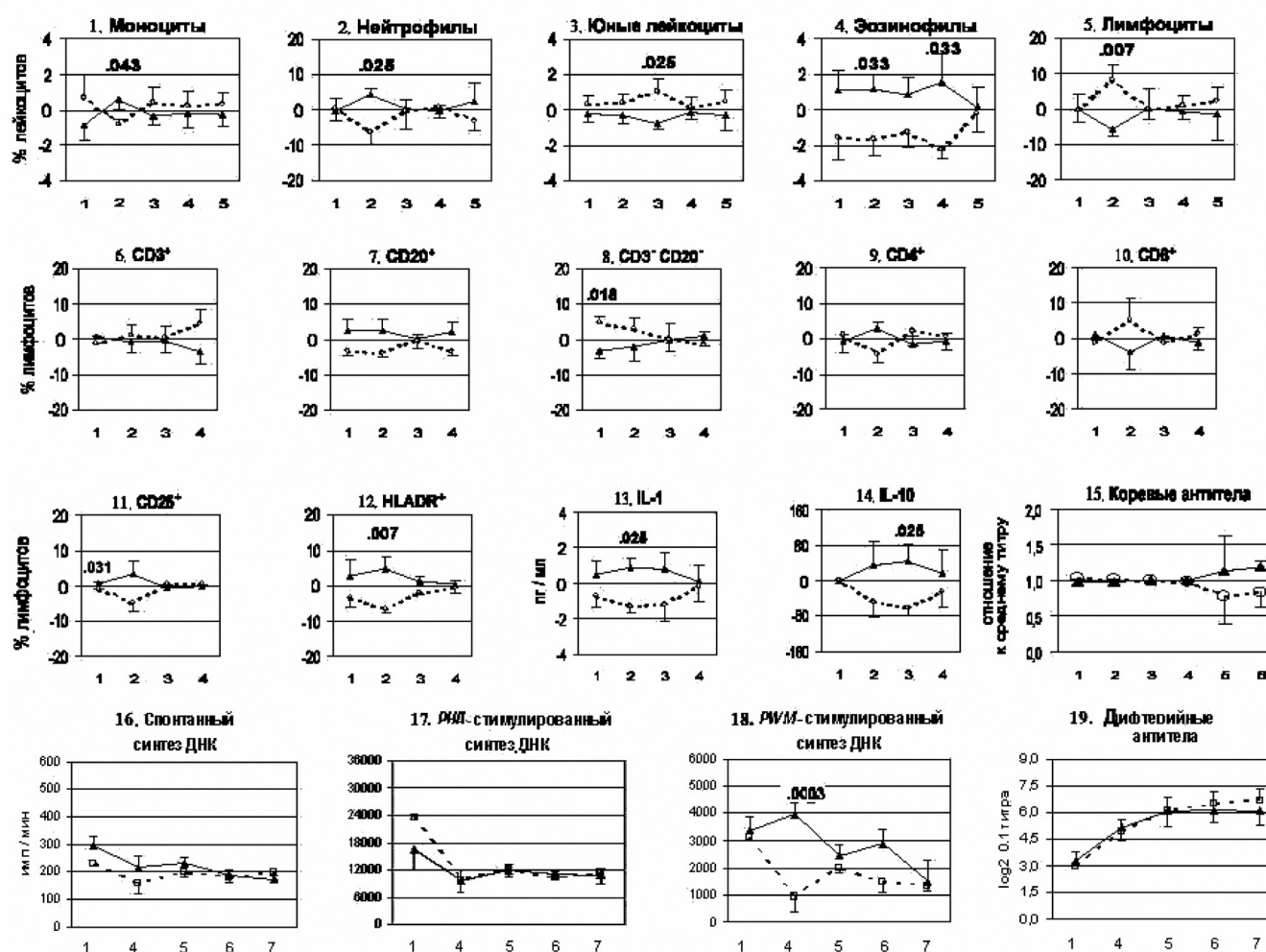


Рис. 1 – 15. Сравнение показателей крови у детей, получавших и не получавших УФ-облучения, после иммунизации коревой и полиомиелитной вакцинами

Рис. 16 – 19. Сравнение показателей крови у детей, получавших и не получавших УФ-облучения, после иммунизации АДСМ/АДС и полиомиелитной вакцинами

На горизонтальных осях указано время взятия образца крови:

1 – в день вакцинации; 2 – через 1 сут, 3 – через 3 сут, 4 – через 7 сут, 5 – через 14 сут, 6 – через 21 сут, 7 – через 1 мес., 8 – через 6 мес., 9 – через 7 мес. после вакцинации

На вертикальных осях указаны:

на рис. 1–5 – доля клеток от общего числа лейкоцитов периферической крови, %;

на рис. 6–12 – доля клеток от числа всех лимфоцитов периферической крови, %;

на рис. 13–14 – концентрация цитокина в плазме, пг/мл;

на рис. 15 – отношение и на рис. 19 – уровни специфических антител в плазме, log титра;

на рис. 16–18 – уровень включения меченого тимидина в  $10^5$  культивированных мононуклеарных клеток, число имп / мин

На рис. 1–14 использованы нормализованные величины, полученные вычитанием из каждого индивидуального показателя его среднего значения для всех сопоставлявшихся детей в день тестирования.

Уровни цитокинов и титры антител приведены в значениях логарифма, для расчетов с которыми вместо концентрации 0 или титра 0 использовали математическое значение 0,1.

Пунктирной линией со светлыми значками и вертикальными отрезками показаны средние величины нормализованного показателя и ошибки среднего у необлучавшихся детей, а сплошной линией и темными значками с вертикальными отрезками – у УФ-облучавшихся детей.

Цифры над значками показывают значимость различий  $p$  (Mann – Whitney U-тест) между УФ-облучавшимися и необлучавшимися детьми в случаях, когда различия оказывались достоверными (при уровне значимости  $p < 0,05$ ).

сроков освобождения от них, обострению скрытой инфекции, понижению устойчивости к повторно-му инфицированию и снижению выживаемости. Механизмы такого угнетения иммунитета частично установлены, и считается, что УФО сдвигают баланс от Th1- ответа к Th2-ответу или подавляют и Th1-, и Th2-ответы, как было описано для модели аллергической астмы [20, 24, 25].

Чтобы оценить, могут ли профилактически-оздоровительные УФО в субэритемных дозах негативно влиять на инфекционный иммунитет человека, мы выясняли в настоящей работе, меняются ли после таких облучений реакции иммунитета детей на вирусные и бактериальные антигены.

В первой части исследования мы установили, что у детей, получавших курс УФО, формирование иммунного ответа на острый инфекционный конъюнктивит к концу 1 нед. заболевания сопровождалось более высоким, чем у необлучавшихся, относительным содержанием в крови  $CD25^+$  клеток. Известно, что рецептор  $CD25^+$  к IL-2 экспрессируется на поверхности находящихся в активированном состоянии и пролиферирующих лимфоцитов. Повышение числа таких лимфоцитов может указывать на их более выраженную активацию в ответ на инфекцию конъюнктивы или на сдвиг такой активации во времени (на более ранний или более поздний срок) по сравнению с необлучавшимися детьми. Кроме того, в ответ на инфекционный конъюнктивит у детей, получавших УФО, не наблюдалось такого увеличения доли НК-клеток в крови, каковое имело место у необлучавшихся. Обнаруживаемое влияние УФО на НК-клетки в период ответа на инфекцию дополняет имеющиеся в литературе сообщения об уменьшении представительства данных клеток в крови и о снижении их активности после УФО [11, 12, 22]. Однако функциональные последствия эффектов УФО в отношении НК-клеток пока не ясны. Важно, что найденные нами отличия по двум параметрам клеточного иммунитета у детей, получавших УФО, по всей видимости, не сказались существенно на эффективности их иммунного контроля над острой инфекцией и воспалением конъюнктивы. Во всяком случае, никаких клинических признаков ослабления иммунной защиты у детей, получавших УФО, не определялось: конъюнктивит развивался одновременно у всех детей первой группы, и его симптомы сохранялись на протяжении недели. Различий в тяжести процесса или скорости выздоровления между УФО-облучавшимися и необлучавшимися детьми выявлено не было.

Во второй части работы мы определили, что курс УФО изменял клеточные реакции, задействованные в ответах на коревую и полиовирусную вакцины, введенные детям сразу после окончания облучений. У детей, получивших УФО, на 1–3-е

сут после вакцинации более высокими оказывались процентное содержание в периферической крови моноцитов, нейтрофилов,  $HLADR^+$  лимфоцитов, концентрации IL-1 бета и IL-10, а число эозинофилов было повышенным в течение всей первой недели после вакцинации. Важно, что указанные отличия в раннем клеточном ответе на иммунизацию не привели к снижению эффективности выработки коревых антител, титры которых через 1 и 7 мес. после вакцинации у детей, получивших УФО, определялись в среднем несколько выше, чем у необлучавшихся, хотя и недостоверно (рис. 15).

В третьей части работы мы обнаружили, что курс УФО, проведенный детям перед введением АДС/АДСМ и полиовирусной вакцин, приводил на 1-й нед. после вакцинации к повышению включения меченого ДНК-предшественника в мононуклеарные клетки, активируемые *in vitro* PWM-митогеном, а на 3-й нед. — к более выраженному увеличению числа моноцитов в периферической крови. Ранее в литературе сообщалось о повышении спонтанного (без стимуляции) включения ДНК-предшественника лимфоцитами периферической крови людей, проводивших неделю на Канарских островах в условиях пляжного отдыха с ежедневными облучениями солнечным светом [6]. Данный эффект авторы той работы связывали с вероятной активацией эксцизионной репарации у лимфоцитов крови в ответ на повреждения их ДНК, возможно, произведенные УФ-лучами, прошедшими через кожу. Наши результаты показывают, что курс субэритемных УФО привел к усилению готовности к плановому синтезу ДНК у той части мононуклеаров, которые *in vitro* отвечают на PWM. Известно, что этот митоген в основном стимулирует В-клетки, и поэтому можно предполагать функциональную активацию этого типа лимфоцитов к исходу 1-й нед. после вакцинации, следовавшей сразу за курсом УФО. К сожалению, в рамках нашей работы не было возможности определить, имела ли место активация именно тех В-клеток крови, которые в данный период были рекрутированы в ответ на введенные вакцины, или же и других пулов В-клеток, задействованных в протекавших в это же время иных иммунных реакциях. Тем не менее, важно отметить, что, несмотря на обнаруженный эффект курса УФО на активность В-клеток, достоверных изменений скорости выработки антител к дифтерийному токсину у детей, получавших УФО, не выявлено (рис. 19).

В настоящей работе мы впервые зарегистрировали достоверное влияние УФО в субэритемных дозах на формирование иммунного ответа человека на вирусные и бактериальные антигены. Выявляемую УФ-индуцированную модуляцию иммунитета по ряду показателей можно расценить как сдвиг

в сторону Th2-ответа, подобный тому, который обнаруживается у животных после УФО в более высоких дозах. На Th2-сдвиг у УФ-облучавшихся детей первой группы указывают снижение в крови представительства NK-клеток в ответе на инфекцию конъюнктивы, а также повышение числа эозинофилов и концентрации IL-10 в ответе на вакцинацию. Известно, что NK-клетки участвуют в формировании Th1-ответа, продуцируя гамма-интерферон, а эозинофилы, напротив, вовлечены в развитие Th2-ответа, продуцируя соответствующие цитокины [13]; что IL-10 способен снижать способность клеток Лангерганса презентировать антиген, снижать экспрессию антигенов гистосовместимости класса II у макрофагов, стимулировать Th2-клетки и индуцировать анаergie у Th1-клеток, способствовать ингибированию продукции Th1-цитокинов активированными Т-клетками и NK-клетками [15]. На активацию Th2-ответа могут указывать и повышение концентрации IL-1 бета в крови к 1-м сут после вакцинации у детей первой группы, получавших УФО, и повышенная готовность В-лимфоцитов отвечать на митоген с 1-й нед. после вакцинации у детей второй группы, получавших УФО. Сдвигом в сторону Th2-ответа можно объяснить и отсутствие клинических реакций на вакцинацию у детей первой группы, получавших УФО, в то время как у троих необлучавшихся детей отмечалось повышение температуры тела на 2-й нед. поствакцинального периода.

В отличие от УФ-индуцируемого угнетения иммунитета у животных с модельными инфекциями, у детей после УФО в субэритемных дозах, несмотря на признаки сдвига клеточных реакций в сторону Th2-ответа, не выявилось признаков снижения иммунного контроля над инфекцией конъюнктивы или ослабления выработки защитных титров антител после вакцинации — ни противокоревых, ни противодифтерийных. Следовательно, наши результаты приводят к главному практическому выводу — об отсутствии подавления инфекционного иммунитета человека УФ-облучениями в субэритемных дозах.

Такой вывод хорошо согласуется и с эпидемиологическими данными. Так, обследование 785 детей в возрасте до 1 года в Нидерландах показало, что у тех из них, кто в летний сезон получал больше солнечных облучений, достоверно более низкой оказывалась частота заболеваний верхних дыхательных путей в последующий осенне-зимний период [23]. В другой работе обследование более тысячи ВИЧ-инфицированных взрослых выявило, что прогрессирование данной инфекции и снижение числа CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов не только не ускорялись, но происходили даже медленнее у тех индивидуумов, кто получал больше естественных солнечных облучений [19].

В сумме, существующие эпидемиологические данные и наши наблюдения за изменениями клеточных и гуморальных показателей иммунитета детей в ответ на иммунизацию вирусными и бактериальными антигенами не подтверждают опасений, что курс субэритемных УФО может понизить устойчивость человека к инфекциям или ослабить вакцинальный иммунитет.

Механизмы позитивных эффектов УФО в отношении инфекционного иммунитета могут быть связаны с образованием в коже витамина D. Ферменты, участвующие в его метаболизме, и рецептор к этому витамину имеются у целого ряда клеток иммунной системы, в частности, у Th1- и Th2-клеток. При активации, например, CD4<sup>+</sup> Т-клеток происходит пятикратное повышение экспрессии их рецептора к витамину, и активная форма витамина 1,25-дигидроксивитамин D3, связываясь с рецептором, регулирует в этих клетках не менее 102 идентифицированных генов [14]. Показано, что активные метаболиты витамина D препятствуют чрезмерной продукции медиаторов воспаления, повышают потенциал «оксидативного взрыва» у макрофагов, стимулируют экспрессию белков с противомикробной активностью в нейтрофилах, моноцитах, NK-клетках и эпителиальных клетках, выстилающих дыхательные пути и другие слизистые [7, 9]. Важную роль в модуляции иммунитета после УФО могут играть и другие медиаторы [10].

Таким образом, для полного понимания механизмов влияния УФО на иммунную систему человека и животных необходимы новые исследования, которые помогут наилучшим образом использовать этот физический фактор для укрепления здоровья детей и взрослых.

**Благодарности.** *Выражаю глубокую признательность сотрудникам НИИ детских инфекций ФМБА России С.М. Харит, О.А. Сосуновой, О.В. Порхаевой, оказавшим неоценимую помощь в выполнении работы, а также всем сотрудникам и персоналу Санкт-Петербургского дома ребенка № 7 за их помощь и каждодневный благородный труд.*

#### Литература

1. Биологическое действие ультрафиолетового излучения / под ред. Г.М. Франка и др. — М.: Наука, 1975. — 279 с.
2. Верженская, Е.М. Применение ультрафиолетовых облучений для профилактики и оздоровления детей в дошкольных учреждениях : методические рекомендации / Е.М. Верженская, Н.Ю. Соломкина, Г.А. Суслова. — СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского педиатрического мединститута, 1996. — 28 с.
3. Руководство по физиотерапии и физиопрофилактике детских заболеваний / под ред. А.Н. Обросова, Т.В. Карачевцевой. — М.: Медицина, 1976. — 393 с.
4. Ультрафиолетовое излучение. Биологическое действие и гигиеническое значение / под ред. Н.М. Данцига. — М.: Медицина, 1966. — 360 с.



5. Ультрафиолетовое излучение. Биологическое действие и использование естественного и искусственного ультрафиолетового излучения в лечебно-профилактических и гигиенических целях / под ред. Н.М. Данцига. — М.: Медицина, 1971. — 368 с.
6. Bech-Thomsen, N. UV-induced alterations in skin and lymphocytes during a one-week holiday in the Canary Islands in May / N. Bech-Thomsen [et al.] // *Acta Derm. Venereol. (Stockh.)* — 1993. — V. 73. — P. 422–425.
7. Canell, J.J. Epidemic influenza and vitamin D / J.J. Canell [et al.] // *Epidemiol. Infect.* — 2006. — V. 134. — P. 1129–1140.
8. Goettsch, W. Comparative immunotoxicology of ultraviolet B exposure I. Effects of in vitro and in situ ultraviolet B exposure on the functional activity and morphology of Langerhans cells in the skin of different species / W. Goettsch [et al.] // *Br. J. Dermatol.* — 1998. — V. 139. — P. 230–238.
9. Grant, W.B. Response to comments by Norval and Woods to my hypothesis regarding vitamin D viral infections and their sequelae / W.B. Grant // *Photochem. Photobiol.* — 2008. — V. 84. — P. 806–808.
10. Hart, P.H. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? / P.H. Hart, S. Gorman, J.J. Finlay-Jones // *Nat. Rev. Immunol.* — 2011. — V. 11. — P. 584–596.
11. Hersey, P. Alteration of T-cell subsets and induction of suppressor T-cell activity in normal subjects after exposure to sunlight / P. Hersey [et al.] // *J. Immunol.* — 1983. — V. 31 — P. 171–174.
12. Hersey, P. Immunologic effects of solarium exposure / P. Hersey [et al.] // *Lancet.* — 1983. — V. 1. — P. 545–548.
13. Kita, H. Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease / H. Kita // *Immunol. Rev.* — 2011. — V. 242 — P. 161–177.
14. Mahon, B. The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells / B. Mahon [et al.] // *J. Cell Biochem.* — 2003. — V. 89. — P. 922–932.
15. Moore, K.W. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor / K.W. Moore [et al.] // *Annu. Rev. Immunol.* — 2001. — V. 19. — P. 683–765.
16. Norval, M. The effect of ultraviolet radiation on human viral infections / M. Norval // *Photochem. Photobiol.* — 2006. — V. 82. — P. 1495–1504.
17. Norval, M. The mechanisms and consequences of ultraviolet-induced immunosuppression / M. Norval // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* — 2006. — V. 92. — P. 108–118.
18. Norval, M. UV-induced changes in the immune response to microbial infections in human subjects and animal models / M. Norval [et al.] // *J. Epidemiol.* — 1999. — V. 9(6 Suppl). — P. 84–92.
19. Saah, A.J. Solar ultraviolet radiation exposure does not appear to exacerbate HIV infection in homosexual men. The Multicenter AIDS Cohort Study / A.J. Saah [et al.] // *AIDS.* — 1997. — V. 11. — P. 1773–1778.
20. Shreedhar, V. A cytokine cascade including prostaglandin E2, interleukin-4, and interleukin-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression / V. Shreedhar [et al.] // *J. Immunol.* — 1998. — V. 160. — P. 3783–3788.
21. Sleijffers, A. UVB exposure impairs immune responses after hepatitis B vaccination in two different mouse strains / A. Sleijffers [et al.] // *Photochem. Photobiol.* — 2002. — V. 75. — P. 541–546.
22. Sleijffers, A. Ultraviolet light and resistance to infectious diseases / A. Sleijffers [et al.] // *J. Immunotoxicol.* — 2004. — V. 1. — P. 3–14.
23. Termorshuizen, F. Exposure to solar ultraviolet radiation and respiratory tract symptoms in 1-year-old children / F. Termorshuizen [et al.] // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* — 2004. — V. 20. — P. 270–271.
24. Ullrich, S.E. Does exposure to UV radiation induce a shift to a Th-2-like immune reaction? / S.E. Ullrich // *Photochem. Photobiol.* — 1996; — V. 64. — P. 254–258.
25. Van Loveren, H. UV exposure alters respiratory allergic responses in mice / H. Van Loveren [et al.] // *Photochem. Photobiol.* — 2000. — V. 72. — P. 253–259.

---

*Автор:*

Снопов Сергей Александрович — старший научный сотрудник лаборатории цитологии опухолевого роста Института цитологии РАН, к.б.н.; тел.: (812)297-42-34, e-mail: snopov@hotmail.com